



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 A61K 39/39, 39/00, 9/107, 9/14</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/29773</p> <p>(43) 国際公開日 1997年8月21日(21.08.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00351</p> <p>(22) 国際出願日 1997年2月10日(10.02.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/25482 1996年2月13日(13.02.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日清製油株式会社(THE NISSHIN OIL MILLS, LTD.)(JP/JP) 〒104 東京都中央区新川1丁目23番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 大山勝彦(OOYAMA, Katsuhiko)(JP/JP) 〒236 神奈川県横浜市金沢区富岡東2丁目5番17号402号 Kanagawa, (JP) 梅村昌史(UMEMURA, Masashi)(JP/JP) 〒233 神奈川県横浜市港南区東永谷3丁目15番30号108号 Kanagawa, (JP) 桜田美穂(SAKURADA, Miho)(JP/JP) 〒239 神奈川県横須賀市野比3丁目1番6号403号 Kanagawa, (JP)</p>		<p>黒川久美子(KUROKAWA, Kumiko)(JP/JP) 〒221 神奈川県横浜市神奈川区羽沢町234 クレイドルHIRO201号 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 野河信太郎(NOGAWA, Shintaro) 〒530 大阪府大阪市北区西天満5丁目1-3 クォーター・ワンビル Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO特許 (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: VACCINE-CONTAINING EMULSION AND VACCINE-CONTAINING POWDER FOR ORAL ADMINISTRATION AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME</p> <p>(54)発明の名称 経口投与用ワクチン含有エマルジョン、ワクチン含有粉末及びそれらの製法</p> <p>(57) Abstract An oil-in-water type vaccine-containing emulsion for oral administration prepared by emulsifying an immunogen with which human or animals can be immunized and a fat in an aqueous medium containing a polyhydric alcohol with the use of at least one hydrophilic nonionic surfactant and at least one lipophilic nonionic surfactant; and a vaccine-containing powder for oral administration obtained by drying this emulsion.</p>		

(57) 要約

人又は動物を免役しうる免疫原と油脂とを、多価アルコールを含有する水性媒体中において、少なくとも1種の親水性非イオン界面活性剤と少なくとも1種の親油性非イオン界面活性剤とによりエマルジョン化してなる水中油型経口投与用ワクチン含有エマルジョン、並びに、該エマルジョンを乾燥処理して得ることができる経口投与用ワクチン含有粉末。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	RD	ルワンダ
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BB	バルバドス	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BF	ブルキナファソ	GE	ジョージア	MC	モナコ	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア	TD	チュニジア
BY	ベラルーシ	HE	ハンガリー	ML	マリ	TG	トーゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MW	モザンビーク	TR	トルコ
CG	コンゴ	JP	日本	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボワール	KG	キルギス	NL	オランダ	US	米国
CM	カメルーン	KR	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CN	中国	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
CO	コロンビア	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド	YU	ユーゴスラビア
DE	ドイツ	LK	スリランカ	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		

## 明細書

経口投与用ワクチン含有エマルジョン、  
ワクチン含有粉末及びそれらの製法

この発明は、経口投与用ワクチン含有エマルジョン、経口投  
5 与用ワクチン含有粉末及びそれらの製法に関する。より詳細に  
は、製剤安定性に優れた経口投与用ワクチン含有エマルジョン、  
容易に再分散しうる経口投与用ワクチン含有粉末及びそれらの  
製法に関する。

人体又は動物を免疫しうる免疫原は、通常、緩衝性の生理食  
10 塩水中に懸濁した状態で用いられている。このような懸濁液は、  
ワクチンと称せられており、ワクチンとしては、不活性化ワク  
チン（例えば、腸チフスワクチン、百日咳ワクチン、狂犬病ワ  
クチン等）、弱毒化ワクチン（例えば、病原菌、ポリオ生ワク  
チン等）、無毒化ワクチン（例えば、ジフテリアトキソイド、  
15 破傷風トキソイド等）等が知られている。

現行のワクチンは、通常、注射の形態、特に皮下注射の状態  
で投与されるため、投与の簡便さに欠けるほか、投与部位での  
発赤、発熱、筋萎縮症又はショック等の副作用を生じ易い欠点  
がある。

20 この欠点を解決する方法として注射によらない投与剤が、例  
えば、特開平 5 - 2 9 4 8 4 5 号公報に提案されているが、さ  
らに、安全性や簡便性等を兼ね備えた経口投与剤の開発が切望

されている。

しかし、経口投与には胃酸によるワクチン内の免疫原の失活や小腸における異物排除の働き等の弊害があるため、その開発は困難とされている。

- 5       そこで、経口投与ワクチンに関して、これまでにリポソーム、マイクロスフェア等を利用した製剤やアジュバント剤を用いたもの等が検討されてきたが、未だ実用化の段階には至っていない。

- 一方、免疫応答の増強、エマルジョンの安定化等の目的で、  
10       マイクロフルイタイザーや超音波乳化器等の機器を使用してワクチンをエマルジョン化して用いる方法が注射剤等で使用されてきている〔WO 90 / 1 4 8 3 7 号（公表公報平 5 - 5 0 8 3 8 5 号）等〕。

- しかし、このように得られたワクチン含有エマルジョンを注  
15       射剤として用いる場合には特に問題ないが、長時間の製剤安定性や経口投与での効果という点では不十分であった。つまり、エマルジョンは不均一な分散系であるため不安定であり、このために製剤自体の安定性が悪く、水と油の分離が起こりやすい。

- なお、これに対して、エマルジョンから水を除去することが  
20       技術的に検討されているが、一旦水分を除去して粉末化したエマルジョンを再び水系に分散させた際に経口用ワクチンに適用可能なように油滴が均一に分散するエマルジョンを得ることが困難であった。また、かかるワクチン含有エマルジョンは、製剤的な面のみならず、効果の面でも十分なものは得られていな

かった。

さらに、液体エマルジョンについては腸溶化が施しにくいことから、経口投与における胃酸等への対処法にも困難性があった。

- 5      本発明によれば、人又は動物を免疫しうる免疫原と油脂とを、  
多価アルコールを含有する水性媒体中において、少なくとも1  
種の親水性非イオン界面活性剤と少なくとも1種の親油性非イ  
オン界面活性剤（但し、混合重量比が20：1～1：1、好ま  
しくは9：1～1：1）とによりエマルジョン化してなる水中  
10   油型経口投与用ワクチン含有エマルジョンが提供される。

また、上記ワクチン含有エマルジョンに、2種以上の油滴界面吸着剤を添加し、乾燥処理して得ることができる経口投与用ワクチン含有粉末が提供される。

- さらに、本発明によれば、(i) 親水性及び親油性非イオン界  
15   面活性剤（但し、混合重量比が20：1～1：1、好ましくは  
9：1～1：1）を熔融混合して混合物を得る工程、  
(ii) 前記混合物に、少量の水を含有する多価アルコールを添加  
するか、又は少量の水及び多価アルコールを別々に添加する工  
程、  
20   (iii) 得られた混合物に油脂を緩やかに攪拌しながら徐々に添  
加する工程、  
(iv) さらに所定量の水を添加する工程からなり、

人又は動物を免疫しうる免疫原を、工程(i)の後であって、

工程 (ii) の前、工程 (ii) ~ (iv) のいずれかの工程中、又は工程 (iv) の後に添加することからなる上記経口投与用ワクチン含有エマルジョンの製法が提供される。

また、上記工程 (i) ~ (iv) からなり、人又は動物を免疫する  
5 免疫原及び油滴界面吸着剤を、同時に又は別々に、工程 (i) の後であって、工程 (ii) の前、工程 (ii) ~ (iv) のいずれかの工程中、又は工程 (iv) の後に添加し、乾燥処理をすることからなる経口投与用ワクチン含有粉末の製法が提供される。

本発明のワクチン含有エマルジョン及びワクチン含有粉末に  
10 おいて、免疫原とは、抗原とも称され、人体又は動物に対し抗体や感作リンパ球を産生させて、体液性免疫や細胞性免疫を誘発する物質をいう。具体的には、感染症の予防のために用いられるものであれば特に限定されるものではなく、ワクチンがあげられる。ワクチンとしては、不活性ワクチン（例えば、イン  
15 フルエンザワクチン、日本脳炎ワクチン、百日咳ワクチン、三種混合ワクチン、コレラワクチン、肺炎球菌ワクチン、ロタワクチン等）、弱毒化ワクチン（例えば、ポリオワクチン、麻疹ワクチン、おたふくかぜワクチン、BCGワクチン、チフスワクチン、痘そうワクチン等）、無毒化ワクチン（例えば、ジフ  
20 テリアワクチン、破傷風ワクチン、ブトキソイド、腸チフスワクチン、ボツリヌスワクチン等）及び成分ワクチン（インフルエンザHAワクチン、B型肝炎ワクチン、非A非B型肝炎ワクチン、ヘルペスワクチン、エイズワクチン、癌ワクチン等）等

## 5

を挙げることができる。これら免疫原は、ワクチン液、ワクチン液の凍結乾燥品をそのまま、あるいはこの凍結乾燥品を用時、リン酸緩衝液、生理食塩水、精製水等に溶解して用いることができる。この際、免疫原はその含有量又は種類等により異なるが、ワクチン含有エマルジョンの全量に対して約 0.001 ~ 約 0.1 重量%程度含有させることが好ましく、約 0.0027 ~ 約 0.011 重量%が特に好ましい。

また、油脂とは、医薬的に低毒性で、経口投与に適する油脂であれば特に限定はされない。中でも、オリーブ油、大豆油、ゴマ油等の植物油が好ましい。油脂の添加量は、ワクチン含有エマルジョンの全量に対して約 2 ~ 約 30 重量%、好ましくは約 2 ~ 約 20 重量%、より好ましくは約 5 ~ 約 15 重量%である。ワクチン含有エマルジョン中に油脂が 30 重量%よりも多い場合には、経口投与した際に下痢等の消化器系の障害を起すことがあり、油脂が 2 重量%未満の場合には、十分な効果が得られないため好ましくない。

さらに、本発明の経口投与用ワクチン含有エマルジョン及びワクチン含有粉末においては、親水性非イオン界面活性剤及び親油性非イオン界面活性剤を両方同時に用いることが必要であり、親水性非イオン界面活性剤及び親油性非イオン界面活性剤は、それぞれ 1 種類又は 2 種類以上を組み合わせ用いることができる。親水性非イオン界面活性剤及び親油性非イオン界面活性剤は、重量比で 20 : 1 ~ 1 : 1 が好ましく、9 : 1 ~ 1 : 1 がより好ましく、7 : 3 ~ 1 : 1 がさらに好ましい。こ

6

れら界面活性剤は、ワクチン含有エマルジョンの全量に対して  
トータルで約 0.5 ～ 約 4.5 重量% 含有させることが好まし  
く、約 2.5 ～ 約 3.5 重量% がより好ましい。また、界面活  
性剤は、親水性及び親油性非イオン界面活性剤を混合したとき  
5 に、HLB 値が 7 ～ 18 の範囲となる組合せが好ましく、11  
～ 14.5 の範囲がより好ましい。

親水性非イオン界面活性剤としては、ポリオキシエチレンソ  
ルビタン脂肪酸エステル（ポリオキシエチレンにおけるオキシ  
エチレンの付加モル数が 1 ～ 100 であり、脂肪酸エステルは  
10 カプロン酸、カプリル酸、カプリン酸、ラウリル酸、ミリスチ  
ン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、パルミトオレイン酸、オ  
レイン酸、リノール酸、リノレン酸等の炭素数 6 ～ 18 の飽和  
又は不飽和の脂肪酸から誘導されたものである）、ポリオキシ  
エチレンソルビトール脂肪酸エステル（オキシエチレンの付加  
15 モル数は上記と同様、脂肪酸エステルは上記と同様の脂肪酸の  
単独又は混合脂肪酸エステル）、ショ糖脂肪酸エステル（HL  
B 値 10 以上であり、脂肪酸エステルは上記と同様）、ポリオ  
キシエチレングリセリン脂肪酸エステル（オキシエチレンの付  
加モル数、脂肪酸エステルは上記と同様）、ポリオキシエチレ  
20 ン脂肪酸エステル（オキシエチレンの付加モル数、脂肪酸エス  
テルは上記と同様）、ポリグリセリン脂肪酸エステル（HLB  
値 10 以上、ポリグリセリンにおけるグリセリンの付加モル数  
は 1 ～ 100 であり、脂肪酸エステルは上記と同様の脂肪酸の  
単独又は混合脂肪酸エステル）；ポリオキシエチレンアルキル



エーテル（オキシエチレンの付加モル数は上記と同様、アルキルエーテルは炭素数 10 ～ 18 のアルキルエーテルである）；  
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（オキシエチレンの付加モル数は上記と同様）等が挙げられる。なかでも、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油が好ましく、具体的には、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレイン酸エステル、ラウロマクロゴール、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油が好ましい。これら親水性非イオン界面活性剤は 1 種又は 2 種以上を組み合わせる用いることができる。例えば、2 種以上を組み合わせる用いる場合には、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油とショ糖脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテルとポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルとショ糖脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテルとポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンアルキルエーテルとショ糖脂肪酸エステルとの組み合わせが好ましい。

親油性非イオン界面活性剤としては、ソルビタン脂肪酸エステル（脂肪酸エステルは上記と同様）、グリセリン脂肪酸エステル（脂肪酸エステルは上記と同様）、ポリグリセリン脂肪酸エステル（HLB 値 10 未満、脂肪酸エステルは上記と同様の脂肪酸の単独又は混合脂肪酸エステル）、ショ糖脂肪酸エステル（HLB 値 10 未満、脂肪酸エステルは上記と同様）、グリセリン・低級モノ又はジカルボン酸・脂肪酸エステル（一方の

## 8

エステルは上記と同様の脂肪酸エステルであり、他方のエステルは、コハク酸、酢酸、酢酸、クエン酸、酒石酸等の低級モノ又はジカルボン酸（但しこれらモノ又はジカルボン酸は水酸基、アセチル基等で置換されていてもよい）のエステルである）等  
5 が挙げられる。なかでも、ソルビタン

脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステルが、具体的には、セスキオレイン酸ソルビタン、モノステアリン酸グリセリンが好ましい。これら親油性非イオン界面活性剤は1種又は2種以上を組み合わせる用いることができる。例えば、2種以上組み  
10 合わせて用いる場合には、ソルビタン脂肪酸エステルとグリセリン脂肪酸エステルとの組み合わせがこのましい。

親水性非イオン界面活性剤と親油性非イオン界面活性剤との組み合わせの好ましい例としては、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルとソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシ  
15 エチレンアルキルエーテルとソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルとグリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテルとグリセリン脂肪酸エステルとの組合せが挙げられる。これらは、HLBが7～18の範囲内になるように組み合わせることが好ましく、  
20 中でもポリオキシエチレンアルキルエーテルであるラウロマクロゴールとソルビタン脂肪酸エステルであるセスキオレイン酸ソルビタンとの組合せが好ましい。

また、本発明のワクチン含有エマルジョンは、多価アルコールを含有する水性媒体にエマルジョン化されてなる。多価アル

コールは、その保水機能から、添加により界面活性剤の会合性が向上し、界面活性剤相に油滴が保持されやすくなると考えられ、また、微細で安定なエマルジョンの形成のために不可欠な界面張力の低下にも役立っていると考えられる。これにより、

5 エマルジョン中での免疫原の状態が良い状態に保たれ、経口投与におけるその効果が保持されと考えられる。多価アルコールとしては、グリセリン、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等が挙げられる。中でもグリセリンが特に好ましい。多価アルコールの含有量は、ワクチン含有エマルジョンの

10 全量に対して約 0.2 ～ 約 1.4 重量%、好ましくは約 0.6 ～ 約 1.0 重量%である。

さらに、本発明のワクチン含有エマルジョンにおいては、上記の各成分とともに基本媒体として水を含有する。従って、本発明のワクチン含有エマルジョンは、水中油型（o/w）である。

15 る。この場合の水としては、蒸留水又は脱イオン水が好ましい。水の添加量は、上述のような各成分の含有量の残部を構成するように用いられる。ただし、得られたエマルジョンを投与することを考慮すると P B S を用いることが好ましい。

また、本発明のワクチン含有エマルジョンは、さらに 2 種以上の油滴界面吸着剤を含有させ、凍結乾燥等の乾燥工程に付す

20 ことにより、ワクチン含有粉末の形態としてもよい。この油滴界面吸着剤は、本発明のワクチン含有エマルジョンを粉体化してワクチン含有粉末とした場合に、微細で均一なエマルジョンの再現を実現する目的で含有させるものであり、油滴と界面の

境界に吸着し、水分散性が高く、常温で固体の化合物を意味する。具体的には、多糖類やタンパク質等の天然の高分子化合物、あるいはポリビニルアルコール等の合成高分子化合物等が挙げられる。中でも、アラビアゴム、シクロデキストリン、デキストリンが好ましく、これらのうちの2種あるいは3種の組合せが好ましい。特に、アラビアゴムと $\beta$ -シクロデキストリンの組合せが好ましい。油滴界面吸着剤は、ワクチン含有エマルジョン中の油脂1重量部に対して約0.8～約3重量部が好ましく、約1重量部（同量）がより好ましい。

10 本発明の経口投与用のワクチン含有エマルジョンは、例えば以下の方法で製造することができる。

(i) まず、親水性及び親油性非イオン界面活性剤をそれらの融点以上の温度にて20:1～1:1、より好ましくは9:1～1:1の割合の量で融解混合して混合物を得る。この際の温度は、使用する非イオン界面活性剤によって異なるが、一般に  
15 室温～70℃であることが好ましい。

(ii) 次いで、得られた混合物に、少量の水を含有する多価アルコールを添加する。この際、多価アルコールと水と割合は、重量比で1:9～1:1程度が好ましく、1:4～2:3がより好ましく、3:7程度がさらに好ましい。添加は、攪拌しながら常温で行うことが好ましい。なお、この際、少量の水及び多価アルコールを、上記の割合となるように、順不同に別々に  
20 添加してもよい。

(iii) 続いて、得られた混合物に、油脂を緩やかに攪拌しな

がら添加する。緩やかに攪拌とは、従来のようなマイクロフ  
ライタイザーや超音波乳化器等の機器による機械的圧力をかけず  
に、自然的乳化力を促す程度であることを意味する。なおこの  
際、攪拌時の発熱により温度が上昇することがあるため、熱に  
5 安定でない免疫原を用いる場合には、油脂は、温度が上昇し  
すぎないように冷却しながら添加することが好ましい。またこの  
際の添加は、徐々に行うことが好ましい。ここで、徐々にとは、  
製造スケールによって異なるため適宜調節することができるが、  
100 g / 分程度以下であればよく、0.1 g / 分 ~ 100 g  
10 / 分程度、さらに1 g / 分 ~ 10 g / 分程度で添加することが  
好ましい。

(iv)さらに、得られた混合液に所定量の水を添加する。この  
場合も緩やかに攪拌しながら、徐々に行うことが好ましい。こ  
こで所定量とは、予め定めた各成分の含有量を調節するのに足  
15 る量である。また、徐々にとは、上述の場合と同様である。

本発明における免疫原は、上述の工程において、(i)の非イ  
オン界面活性剤の加温融解混合後であれば、いずれであっても  
よい。具体的には、少量の水を含有する多価アルコールを添加  
する工程(ii)、油脂を添加する工程(iii)、水を添加する工程  
20 (iv)のいずれかの工程で、又は工程(ii)の前に、あるいは工程  
(iv)の後のいずれで添加してもよい。しかし、できるかぎり後  
工程で添加するのが好ましく、工程(iv)又は工程(iv)の後で添  
加するのが最も好ましい。

さらに、別の製法として、親水性及び親油性非イオン界面活

性剤、多価アルコール及び少量の水を非イオン界面活性剤の融点以上の温度、一般に室温～70℃にて融解混合して混合物を得、これに、油脂を緩やかに攪拌しながら、徐々に添加し、さらに所定量の水を添加混合してゆくことで、微細で安定な水中油型エマルジョンを得ることができる。この場合、免疫原は融解混合後であればどの工程で添加してもよいが、できるかぎり後工程で、工程(iv)又は工程(iv)の後で添加するのが最も好ましい。

なお、上述の方法は、自然的乳化力を利用するもので、従来の機械的圧力を利用するエマルジョン化方法に比し、ワクチン効果を引き出すための油脂や界面活性剤の添加量が減少でき、安全性の面で優れ、また、製造装置等のコストの面でも優れている。さらには、ワクチンの失活を防止する面においても優れている。

得られたワクチン含有エマルジョンは、経口投与剤として、そのまま用いることができる。しかし、胃酸によるワクチンの失活を防止するための腸溶製剤化を施すために、又は保存安定性向上のために粉体化することが好ましい。

以下に、本発明における経口投与用ワクチン含有粉末の製法について説明する。

上述のようにして得られたワクチン含有エマルジョンに、油滴界面吸着剤をそのままの形態、あるいは懸濁液等の形態で添加、混合する。あるいは、ワクチン含有エマルジョンの製造工程中であって、非イオン界面活性剤を融解混合した後、多価ア

## 13

アルコールを添加した後又は同時に、非イオン界面活性剤と多価アルコールを融解混合した後、油脂を添加した後又は同時に、あるいは水を添加した後又は同時に、油滴界面吸着剤を添加してもよい。なお、これらの場合には、免疫原は、油滴界面吸着剤の添加とともに、あるいは別々に、油滴界面吸着剤を添加した後に添加してもよい。

次いで、このように油滴界面吸着剤が添加された後、例えば凍結乾燥法、噴霧乾燥、脱水乾燥等の方法に付すことにより粉体化することができる。中でも、凍結乾燥法が好ましい。但し、混合物を脱水乾燥する方法は、免疫原におけるタンパクの変性を避けるために、50℃以下の条件で行うことが望ましい。なお、凍結乾燥法等により粉体化する前には、得られたエマルジョン化ワクチンに水又はPBSを添加することにより、エマルジョン化ワクチン全量に対する油脂の量を1～5重量%、好ましくは2重量%程度に調節することが好ましい。

このようにして得られたワクチン含有粉末は、水性媒体に容易に再分散できる。また、顆粒剤、錠剤、丸剤、マイクロカプセル剤、硬又は軟カプセル剤等の形態で用いることができる。

一方、ワクチン含有エマルジョンは、硬又は軟カプセル剤等の形態で用いることができる。

これらの製剤は、ワクチンの十分な効果を期待するために、腸溶性製剤であることが好ましい。

顆粒剤、錠剤、丸剤とするために、通常医薬的に受容な賦形剤または担体（例えば、グルコース等の単糖類、ラクトース等

14

の二糖類、プルラン、デキストリン等の多糖類、トウモロコシ澱粉、バレイショ澱粉等の澱粉類）、結合剤（例えば、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース等）、崩壊剤（例えば、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、結晶セルロース、部分 $\alpha$ 化澱粉等）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク等）の各種添加剤が適宜利用される。また、マイクロカプセル剤とするために、上記のような医薬的に受容な賦形剤、被膜形成剤、溶剤等が適宜選択利用される。硬又は軟カプセル剤は、一般にゼラチンで形成される。各製剤の腸溶化に使用される被膜形成剤は、例えば、当該分野で公知のものを適宜選択して用いることができる。例えば、メタクリル酸・メタクリル酸アルキルエステルコポリマー、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート、カルボキシメチルエチルセルロース、セルロースアセテートフタレート、精製シェラック、白色シェラック、エチルセルロース、アミノアルキルメタクリレートポリマー等が挙げられる。腸溶化は、一般に予め各製剤を作製後に行われる。上記のような各製剤は、当該分野で公知の方法を利用して行うことができる。

本発明のワクチン含有エマルジョン及びワクチン含有粉末の経口投与量は、使用する免疫原の種類により変動するが、通常大人1人1回当たり免疫原が約12,5～10000 ( $\mu$ g)



の量で用いるのが好ましい。また、投与量は他の組成分量、投与回数、接種対象者の性別、年齢等によっても変動する。例えば、インフルエンザを免疫原として用いた場合には、通常大人 1 人当たり、インフルエンザが 1 回 12.5 ~ 10000 ( $\mu$ g) 含有される量で経口投与し、抗体価の上昇がみられない場合は、2 ~ 4 週間後に追加投与することができる。

以下に、本発明の経口投与用ワクチン含有エマルジョン、ワクチン含有粉末及びそれらの製法について、実施例を挙げて説明するが、これらに限定されるものではない。

#### 10 実施例 1

ラウロマクロゴール（商品名 BL-21；日光ケミカルズ製、以下同様）9 g 及びセスキオレイン酸ソルビタン（商品名 SO-15；日光ケミカルズ製、以下同様）9 g を混合し、60℃にて加熱融解させ、これにグリセリン（ナカライテスク製、以下同様）3.6 g 及び少量の水を常温で混合した。ここへ、攪拌しながら大豆油（日清製油株式会社製、以下同様）60 g を徐々に添加した。

さらにインフルエンザインタクトワクチン（A／貴州／54／89 H3N2、以下同様）水溶液を徐々に添加混合し、油量が 10 重量％になるようにリン酸緩衝液（PBS）にて希釈調製し、抗原量が 27  $\mu$ g/ml のインフルエンザワクチン含有エマルジョンを得た。

実施例 2

ラウロマクロゴール 9 g 及びセスキオレイン酸ソルビタン 9 g を混合し、60℃にて加熱融解させ、これにグリセリン 3.6 g 及び少量の水を常温で混合した。ここへ、攪拌しながらオリーブ油（五協産業製、以下同様）60 g を徐々に添加した。

さらにインフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に添加混合し、油量が10重量%になるようにPBSにて希釈調製し、抗原量が27  $\mu$ g/ml のインフルエンザワクチン含有エマルジョンを得た。

実施例 3

ラウロマクロゴール 12.6 g 及びセスキオレイン酸ソルビタン 5.4 g を混合し、60℃にて加熱融解させ、これにグリセリン 3.6 g 及び少量の水を常温で混合した。ここへ、攪拌しながら大豆油 60 g を徐々に添加した。

さらにインフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に添加混合し、油量が10重量%になるようにPBSにて希釈調製し、抗原量が27  $\mu$ g/ml のインフルエンザワクチン含有エマルジョンを得た。

20 実施例 4

ラウロマクロゴール 16.2 g 及びセスキオレイン酸ソルビタン 1.8 g を混合し、60℃にて加熱融解させ、これにグリセリン 3.6 g 及び少量の水を常温で混合した。ここへ、攪拌しながら大豆油 60 g を徐々に添加した。

さらにインフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に添加混合し、油量が10重量%になるようにPBSにて希釈調製し、抗原量が $27\mu\text{g}/\text{ml}$ のインフルエンザワクチン含有エマルジョンを得た。

#### 5 実施例 5

ラウロマクロゴール9g及びセスキオレイン酸ソルビタン9gを混合し、60℃にて加熱融解させ、これにグリセリン3.6g及び少量の水を常温で混合した。ここへ、攪拌しながら大豆油180gを徐々に添加した。

- 10 さらにインフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に添加混合し、油量が30重量%になるようにPBSにて希釈調製し、抗原量が $27\mu\text{g}/\text{ml}$ のインフルエンザワクチン含有エマルジョンを得た。

#### 実施例 6

- 15 ラウロマクロゴール13.5g及びセスキオレイン酸ソルビタン13.5gを混合し、60℃にて加熱融解させ、これにグリセリン3.6g及び少量の水を常温で混合した。ここへ、攪拌しながら大豆油180gを徐々に添加した。

- 20 さらにインフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に添加混合し、油量が30重量%になるようにPBSにて希釈調製し、抗原量が $27\mu\text{g}/\text{ml}$ のインフルエンザワクチン含有エマルジョンを得た。

#### 実施例 7

ラウロマクロゴール12.6g、セスキオレイン酸ソルビタ

ン 5. 4 g、グリセリン 3. 6 g 及び少量の水を混合し、60℃に加温融解させた。ここへ、攪拌しながら大豆油 180 g を徐々に添加した。

さらにインフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に添加混合し、油量が 30 重量%になるように P B S にて希釈調製し、抗原量が  $27 \mu\text{g}/\text{ml}$  のインフルエンザワクチン含有エマルジョンを得た。

#### 実施例 8

ラウロマクロゴール 18. 9 g 及びセスキオレイン酸ソルビタン 8. 1 g を混合し、60℃にて加熱融解させ、これにグリセリン 3. 6 g 及び少量の水を常温で混合した。ここへ、攪拌しながらゴマ油（九鬼産業製、以下同様）60 g を徐々に添加した。

さらにインフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に添加混合し、油量が 10 重量%になるように P B S にて希釈調製し、抗原量が  $27 \mu\text{g}/\text{ml}$  のインフルエンザワクチン含有エマルジョンを得た。

#### 実施例 9

ラウロマクロゴール 9 g 及びセスキオレイン酸ソルビタン 9 g これにグリセリン 3. 6 g 及び少量の水を常温で混合し、60℃にて加熱融解させた。ここへ、攪拌しながらゴマ油 60 g を徐々に添加した。

さらにインフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に添加混合し、油量が 10 重量%になるように P B S にて希釈調製

し、抗原量が  $27 \mu\text{g} / \text{ml}$  のインフルエンザワクチン含有エマルジョンを得た。

#### 実施例 10

ラウロマクロゴール 9 g 及びセスキオレイン酸ソルビタン  
5 9 g を混合し、 $60^\circ\text{C}$  にて加熱融解させ、これにグリセリン  
3.6 g 及び少量の水を常温で混合した。ここへ、攪拌しながら  
ゴマ油 180 g を徐々に添加した。

さらにインフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に添  
加混合し、油量が 30 重量% になるように PBS にて希釈調製  
10 し、抗原量が  $27 \mu\text{g} / \text{ml}$  のインフルエンザワクチン含有エ  
マルジョンを得た。

#### 実施例 11

ラウロマクロゴール 12.6 g 及びセスキオレイン酸ソルビ  
タン 5.4 g、グリセリン 3.6 g 及び少量の水を混合し、  
15  $60^\circ\text{C}$  に加熱融解させた。ここへ、攪拌しながらゴマ油 60 g を  
徐々に添加した。

さらにインフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に添  
加混合し、油量が 10 重量% になるように PBS にて希釈調製  
し、抗原量が  $27 \mu\text{g} / \text{ml}$  のインフルエンザワクチン含有エ  
20 マルジョンを得た。

#### 実施例 12

ラウロマクロゴール 9 g 及びセスキオレイン酸ソルビタン  
9 g を混合し、 $60^\circ\text{C}$  にて加温融解させ、これにグリセリン  
3.6 g 及び少量の水を常温で混合した。ここへ、攪拌しながら

らオリーブ油 180 g を徐々に添加した。

さらにインフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に添加混合し、油量が 30 重量 % になるように P B S にて希釈調製し、抗原量が  $27 \mu\text{g} / \text{ml}$  のインフルエンザワクチン含有エ  
5 マルジョンを得た。

### 実施例 1 3

ラウロマクロゴール 13.5 g 及びセスキオレイン酸ソルビタン 13.5 g、グリセリン 6 g 及び少量の水を混合し、60  
℃ に加温融解させた。ここへ、攪拌しながらオリーブ油 180  
10 g を徐々に添加した。

さらにインフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に添加混合し、油量が 30 重量 % になるように P B S にて希釈調製し、抗原量が  $27 \mu\text{g} / \text{ml}$  のインフルエンザワクチン含有エ  
マルジョンを得た。

### 15 実施例 1 4

モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン（商品名 T O  
ー 10 M；日光ケミカルズ製、以下同様）24.3 g 及びセスキオレイン酸ソルビタン 2.7 g を混合し、60℃ にて加温融  
解させ、これにグリセリン 1.2 g 及び少量の水を常温で混合  
20 した。ここへ、攪拌しながら大豆油 60 g を徐々に添加した。

さらにインフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に添加混合し、油量が 10 重量 % になるように P B S にて希釈調製し、抗原量が  $27 \mu\text{g} / \text{ml}$  のインフルエンザワクチン含有エ  
マルジョンを得た。

実施例 1 5

モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン 1 2 . 6 g 及びモノステアリン酸グリセリン（商品名 M G S - B ; 日光ケミカルズ製、以下同様） 5 . 4 g を混合し、6 0 °C にて加温融解  
5 させ、これにグリセリン 3 . 6 g 及び少量の水を常温で混合した。ここへ、攪拌しながら大豆油 6 0 g を徐々に添加した。

さらにインフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に添加混合し、油量が 1 0 重量% になるように P B S にて希釈調製し、抗原量が 2 7  $\mu$  g / m l のインフルエンザワクチン含有エ  
10 マルジョンを得た。

実施例 1 6

ラウロマクロゴール 9 g 及びモノステアリン酸グリセリン 9 g を混合し、6 0 °C にて加温融解させ、これにグリセリン 3 . 6 g 及び少量の水を常温で混合した。ここへ、攪拌しながら大  
15 豆油 6 0 g を徐々に添加した。

さらにインフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に添加混合し、油量が 1 0 重量% になるように P B S にて希釈調製し、抗原量が 2 7  $\mu$  g / m l のインフルエンザワクチン含有エマルジョンを得た。

20 実施例 1 7

ラウロマクロゴール 9 g 及びセスキオレイン酸ソルビタン 9 g を混合し、6 0 °C にて加温融解させ、これにグリセリン 3 . 6 g を常温で混合した。これを冷却した後、ここへ最終的に抗原量が 2 7  $\mu$  g / m l となる量のインフルエンザインタク

トワクチンを溶解させた少量の水を添加混合した。

ここへ、冷却しながら大豆油 60 g を徐々に攪拌混合した。

さらに、油量が 10 重量% になるように P B S にて希釈調製し、抗原量が  $27 \mu\text{g} / \text{ml}$  のインフルエンザワクチン含有エマルジョンを得た。

#### 実施例 18

実施例 1 で作製したインフルエンザワクチン含有エマルジョン 30 ml に、油量が 2 重量% になるように、水に分散させたアラビアゴム（三栄薬品貿易製、以下同様）1.35 g、 $\beta$ -シクロデキストリン（日本食品化工製、以下同様）1.65 g を添加し、攪拌混合した。これを、凍結乾燥することにより、粉体インフルエンザワクチン含有エマルジョンを得た。

#### 実施例 19

ラウロマクロゴール 9 g、セスキオレイン酸ソルビタン 9 g、グリセリン 3.6 g 及び少量の水を混合し、60℃ に加温融解させた。ここへ、水に分散させたアラビアゴム 27 g、 $\beta$ -シクロデキストリン 33 g を添加し、攪拌混合した。この混合物へ攪拌しながら大豆油 60 g を徐々に添加した。

さらにインフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に添加混合し、油量が 2 重量% になるように P B S にて希釈調製し、抗原量が  $5.4 \mu\text{g} / \text{ml}$  のインフルエンザワクチン含有エマルジョンを得た。これを凍結乾燥することにより、粉体インフルエンザワクチン含有エマルジョンを得た。



実施例 2 0

ラウロマクロゴール 9 g、セスキオレイン酸ソルビタン 9 g、  
グリセリン 3.6 g 及び少量の水を混合し、60℃に加温融解  
させた。ここへ、水に分散させたアラビアゴム 30 g、デキス  
5 トリン（松谷化学製）30.6 g、 $\beta$ -シクロデキストリン  
25.4 g を添加し、攪拌混合した。この混合物へ攪拌しながら大豆油 60 g を徐々に添加した。

さらにインフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に添  
加混合し、油量が 2 重量%になるように P B S にて希釈調製し、  
10 抗原量が 5.4  $\mu$ g / ml のインフルエンザワクチン含有エマ  
ルジョンを得た。これを凍結乾燥することにより、粉体インフ  
ルエンザワクチン含有エマルジョンを得た。

実施例 2 1

モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン 24.3 g、  
15 セスキオレイン酸ソルビタン 2.7 g、グリセリン 3.6 g 及  
び少量の水を混合し、60℃にて加温融解させた。ここへ、水  
に分散させたアラビアゴム 79 g、 $\beta$ -シクロデキストリン  
12.7 g を添加し、攪拌混合した。この混合物へ攪拌しながら大豆油 60 g を徐々に添加した。

20 さらにインフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に添  
加混合し、油量が 2 重量%になるように P B S にて希釈調製し、  
抗原量が 5.4  $\mu$ g / ml のインフルエンザワクチン含有エマ  
ルジョンを得た。

これを凍結乾燥することにより、粉体インフルエンザエマル

ジョン化ワクチンを得た。

### 実施例 2 2

ラウロマクロゴール 9 g、セスキオレイン酸ソルビタン 9 g、  
グリセリン 3.6 g 及び少量の水を混合し、60℃に加熱融解  
5 させた。ここへ、攪拌しながら大豆油 60 g を徐々に添加し、  
攪拌混合した。この混合物へ水に分散させたアラビアゴム 57.6 g、 $\beta$ -シクロデキストリン 57.9 g を添加した。

さらに、インフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に  
添加混合し、油量が 2 重量%になるように P B S にて希釈調製  
10 し、抗原量が 5.4  $\mu$ g/ml のインフルエンザワクチン含有  
エマルジョンを得た。これを凍結乾燥することにより、粉体イ  
ンフルエンザワクチン含有エマルジョンを得た。

### 実施例 2 3

ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（商品名 H C O - 6 0 : 日  
15 光ケミカルズ製）8.1 g、セスキオレイン酸ソルビタン 0.9 g  
及びショ糖カプリル酸エステル（商品名 S M - 8 8 0 : 三  
菱化学フーズ製）9.0 g を混合し、60℃にて加熱融解させ、  
これにグリセリン 3.6 g 及び少量の水を常温で混合した。こ  
こへ、攪拌しながら大豆油（ナカライテスク製）60 g を徐々  
20 に添加した。

さらに、インフルエンザインタクトワクチン水溶液を徐々に  
添加混合し、油量が 10 重量%になるように P B S にて希釈調  
製し、抗原量が 27  $\mu$ g/ml のインフルエンザワクチン含有  
エマルジョンを得た。

実施例 2 4

実施例 1 8 で作製した粉体インフルエンザワクチン含有エマルジョン 1 g を水又は P B S 9 0 0 g へ溶解させたところ、30 分以内に速やかに再分散し、再分散 1 時間後においても油うきは認められなかった。

さらに、粉体化前のエマルジョンと再分散後のエマルジョンの粒子径の変化をサブミクロン粒子分析装置（C O U L T E R N 4 S D 型）にて観察したところ、微細で均一なエマルジョン状態が保持されていることが確認された。

10 以下の表 1 に結果を示す。 単位：（n m）

【表 1】

	粉体化前	再分散後
実施例 1 8	3 8 0	3 5 0

実施例 2 5

実施例 1 8 で得た粉体インフルエンザワクチン含有エマルジョンに遠心流動型コーティング造粒装置（S P I R - A - F L O W : フロイント産業社製）を用い、腸溶性被膜を施した。

15 腸溶性被膜を施す際の腸溶性被膜液処方を表 2 に示す。

【表 2】

ヒドロキシプロピルメチルセルロース アセテートスクシネート (HPMC-AS)	5 . 2 重量部
アセチル化モノグリセライド	0 . 5 重量部
塩化メチレン	4 7 . 2 重量部
エタノール	4 7 . 1 重量部

なお、腸溶性被膜量は、粉体インフルエンザエマルジョン化ワクチンに対して H P M C - A S が約 1 5 重量 % となるようにした。得られた腸溶性粉体インフルエンザワクチン含有エマルジョン製剤は、日本薬局法の崩壊試験法の腸溶性製剤の項に従う崩壊試験に適合した。

#### 実施例 2 6

実施例 1 8 で得た粉体インフルエンザワクチン含有エマルジョンを硬カプセルに充填し、P A N コーティング装置 ( H I - C O R T E R . 4 8 N 型 : フロイント産業社製 ) を用い、腸溶性被膜を施した。腸溶性被膜処方 は 上記と同様の方法で行った。

#### 試験例 1

実施例 1 で作製したインフルエンザワクチン含有エマルジョンをマウス ( d d Y 雌 6 ~ 7 週令 : 1 群 1 0 匹、以下同様 ) に  $2 7 \mu g / m l$  を  $1 m l$  経口投与 ( 1 次免疫 ) した。投与 3 週後に採血を行ない、さらに 1 次免疫と同条件で 2 次免疫を行ない、その 2 週後 ( 1 次免疫 5 週後 ) に採血を行った。これらの免疫 3 及び 5 週後に得られた血清を評価に供した。

これらの血中の特異的抗体量をH I 価（ヘムアルグニチン  
インヒビション アッセイ）を測定することで、評価を行った。  
その結果を表 3 に示す。一般的にこのH I 価とは1 2 8 H I 以  
上で有効（感染防御能がある抗体量）とされている。

【表 3】

	H I 価	
	実験 1	実験 2
3 週後血清	1 2 8 H I	2 5 6 H I
5 週後血清	5 1 2 H I	5 1 2 H I

## 5 試験例 2

実施例 2 で作製したインフルエンザワクチン含有エマルジョ  
ンをマウスに  $27 \mu\text{g}/\text{ml}$  を  $1 \text{ ml}$  経口投与（1 次免疫）し  
た。投与 3 週後に採血を行ない、さらに 1 次免疫と同条件で 2  
次免疫を行ない、その 2 週後（1 次免疫 5 週後）に採血を行っ  
10 た。これらの免疫 3 及び 5 週後に得られた血清を評価に供した。

これらの血中の特異的抗体量をH I 価を測定することで評価  
を行った。その結果を表 4 に示す。

【表 4】

	H I 価	
	実験 1	実験 2
3 週後血清	1 2 8 H I	2 5 6 H I
5 週後血清	5 1 2 H I	5 1 2 H I

## 試験例 3

実施例 3 で作製したインフルエンザワクチン含有エマルジョ

ンをマウスに  $27 \mu\text{g}/\text{ml}$  を  $1 \text{ ml}$  経口投与（1次免疫）した。投与3週後に採血を行ない、得られた血清を評価に供した。

これらの血中の特異的抗体量をH I 価を測定することで評価を行った。その結果を表5に示す。

【表5】

	H I 価	
	実験 1	実験 2
3 週後血清	1 2 8 H I	6 4 H I

#### 5 試験例 4

実施例4で作製したインフルエンザワクチン含有エマルジョンをマウスに  $27 \mu\text{g}/\text{ml}$  を  $1 \text{ ml}$  経口投与（1次免疫）した。投与3週後に採血を行ない、得られた血清を評価に供した。

これらの血中の特異的抗体量をH I 価を測定することで評価を行った。その結果を表6に示す。

【表6】

	H I 価	
	実験 1	実験 2
3 週後血清	1 2 8 H I	6 4 H I

#### 試験例 5

実施例5で作製したインフルエンザワクチン含有エマルジョンをマウスに  $27 \mu\text{g}/\text{ml}$  を  $1 \text{ ml}$  経口投与（1次免疫）した。投与3週後に採血を行ない、得られた血清を評価に供した。

15 これらの血中の特異的抗体量をH I 価を測定することで評価

を行った。その結果を表 7 に示す。

【表 7】

	H I 価	
	実験 1	実験 2
3 週後血清	6 4 H I	1 2 8 H I

#### 試験例 6

実施例 6 で作製したインフルエンザワクチン含有エマルジョンをマウスに  $27 \mu\text{g}/\text{ml}$  を  $1 \text{ ml}$  経口投与（1 次免疫）した。投与 3 週後に採血を行ない、得られた血清を評価に供した。

これらの血中の特異的抗体量を H I 価を測定することで評価を行った。その結果を表 8 に示す。

【表 8】

	H I 価	
	実験 1	実験 2
3 週後血清	1 2 8 H I	1 2 8 H I

#### 試験例 7

実施例 7 で作製したインフルエンザワクチン含有エマルジョンをマウスに  $27 \mu\text{g}/\text{ml}$  を  $1 \text{ ml}$  経口投与（1 次免疫）した。投与 3 週後に採血を行ない、得られた血清を評価に供した。

これらの血中の特異的抗体量を H I 価を測定することで評価を行った。その結果を表 9 に示す。

【表 9】

	H I 価			
	実験 1		実験 2	
3 週 後 血 清	1	2 8 H I	1	2 8 H I

なお、上記試験例 3～5 においては、1 回の免疫で血中の抗体が有効量に達していないが、実施例 1、2 の結果から 2 次免疫後には 1 次免疫後の 2～4 倍の抗体量が産生されているので、これらも 2 次免疫を行えば、確実に有効な抗体量が産生される  
5 ものと考えられる。

#### 試験例 8

実施例 2 3 で作製したインフルエンザワクチン含有エマルジョンをマウスに  $27 \mu\text{g}/\text{ml}$  を  $1 \text{ ml}$  経口投与（1 次免疫）した。投与 3 週後に採血を行ない、さらに 1 次免疫と同条件で 2 次免疫を行い、その 2 週間（1 次免疫 5 週間）に採血を行った。これらの免疫 3 及び 5 週後に得られた血清を評価に供した。

これらの血中の特異的抗体量を H I 価を測定することで評価した。その結果を表 10 に示す。

【表 10】

	H I 価
3 週 後 血 清	< 3 2 H I
5 週 後 血 清	2 5 6 H I



試験例 9（粉体化エマルジョンのインビトロ試験）

実施例 18 のサンプルを用いて粉体化前エマルジョンと粉体化後再分散エマルジョンのインビトロにおける抗原性を確認したところインフルエンザワクチン液とほぼ同じ抗原量であった。

5 このことより、粉体化に伴う抗原性の低下はないと考えられる。

## ・ 実験方法

それぞれのサンプルを 5 C C A / m l になるよう P B S で調製し、インフルエンザワクチン液による検量線を作成し、E L I S A 法により測定された吸光度から、ワクチン液の抗原量を

10 理論値として、サンプルの抗原量を算出した。

## （E L I S A 法）

1) 96 ウェルプレートに 1 次抗体である抗 H A 蛋白（マウス I g G クローン G 7 G 1 2） $10 \mu g / m l$ （ $\times 200$ 、P B S（-）中）を  $50 \mu l /$ ウェル加え、コーティングし、 $4^{\circ}C$

15 にて 1 晩放置した。

2) ブロックエース（ $\times 4$ 、蒸留水中）を  $200 \mu l /$ ウェル加えて  $4^{\circ}C$  にて 1 晩放置した。

3) T P B S（P B S + 0.005% トウイーン 20）を用いてウェルを洗浄した（3 回）。

20 4) サンプルを  $100 \mu l /$ ウェル加えた。

5)  $37^{\circ}C$  で 1 時間放置した。

6) T P B S を用いてウェルを洗浄した（3 回）。

7) 2 次抗体であるビオチン化抗 H A 蛋白（ $\times 2000$ 、T P B S 中）を  $100 \mu l /$ ウェル加えて  $37^{\circ}C$  にて 1 時間放置し

た。

8) T P B S を用いてウェルを洗浄した (3 回)。

9) 発色用酵素である Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate ( $\times 4000$ 、T P B S 中) を  $100 \mu\text{l}$  / ウェル 5 加えて  $37^\circ\text{C}$  にて 1.5 時間放置した。

10) T P B S を用いてウェルを洗浄した (6 回)。

11) 発色用基質 [T M B (tetramethyl benzidine) : Peroxidase Solution B = 1 : 1 で混合] を  $100 \mu\text{l}$  / ウェル 加えて室温で 20 分間放置した。

10 12) 反応停止液として 1 M リン酸溶液を  $100 \mu\text{l}$  / ウェル 加えた。

13) マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定した ( $450 \text{ nm} / 595 \text{ nm}$ )。

14) 検量線を作成し、対照サンプルを理論値として検体の抗原量を % 表示した。

・結果を表 11 に示す。

【表 11】

	抗原量 %
ワクチン液	94 %
対象エマルジョン (粉体化前)	101 %
再分散エマルジョン (粉体化後)	93 %

## 請求の範囲

1. 人又は動物を免疫しうる免疫原と油脂とを、多価アルコールを含有する水性媒体中において、少なくとも1種の親水性非イオン界面活性剤と少なくとも1種の親油性非イオン界面活性剤とによりエマルジョン化してなる水中油型経口投与用ワクチン含有エマルジョン。
2. 親水性非イオン界面活性剤と親油性非イオン界面活性剤とが、20 : 1 ~ 1 : 1の混合重量比で含有されてなる請求項1記載のワクチン含有エマルジョン。
- 10 3. 親水性非イオン界面活性剤と親油性非イオン界面活性剤とが、9 : 1 ~ 1 : 1の混合重量比で含有されてなる請求項2記載のワクチン含有エマルジョン。
4. 親水性非イオン界面活性剤と親油性非イオン界面活性剤との総量が、エマルジョン中0.5 ~ 4.5重量%で含有されてなる請求項1 ~ 3記載のいずれかに記載のワクチン含有エマルジョン。
- 15 5. 親水性非イオン界面活性剤と親油性非イオン界面活性剤とが、7 ~ 18のHLBとなるように組み合わせられる請求項1 ~ 4のいずれかに記載のワクチン含有エマルジョン。
- 20 6. 親水性非イオン界面活性剤と親油性非イオン界面活性剤とが、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルとソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテルとソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルとグリセリン脂肪酸エステル又はポリオキシエチレ

ンアルキルエーテルとグリセリン脂肪酸エステルとの組合せである請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載のワクチン含有エマルジョン。

7. 免疫原が、エマルジョン中 0.001 ～ 0.1 重量 % の量で含有されてなる請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載のワクチン含有エマルジョン。

8. 油脂が、エマルジョン中 2 ～ 30 重量 % の量で含有されてなる請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載のワクチン含有エマルジョン。

10 9. 油脂が、エマルジョン中 5 ～ 15 重量 % の量で含有されてなる請求項 8 記載のワクチン含有エマルジョン。

10. 油脂が、オリーブ油、大豆油又はゴマ油の 1 種又は 2 種以上の組み合わせである請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載のワクチン含有エマルジョン。

15 11. 多価アルコールが、エマルジョン中 0.2 ～ 1.4 重量 % の量で含有されてなる請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載のワクチン含有エマルジョン。

12. 多価アルコールが、グリセリン、ポリエチレングリコール又はプロピレングリコールである請求項 1 ～ 11 のいずれかに記載のワクチン含有エマルジョン。

13. 請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載のワクチン含有エマルジョンに、2 種以上の油滴界面吸着剤を添加し、乾燥処理して得ることができる経口投与用ワクチン含有粉末。

14. 油滴界面吸着剤が、アラビアゴムと  $\beta$ -シクロデキスト

リンとの組合せである請求項 13 記載の経口投与用ワクチン含有粉末。

15. (i) 親水性及び親油性非イオン界面活性剤（但し、混合重量比が 20 : 1 ~ 1 : 1）を溶融混合して混合物を得る工程、

5 (ii) 前記混合物に、少量の水を含有する多価アルコールを添加するか、又は少量の水及び多価アルコールを別々に添加する工程、

(iii) 得られた混合物に油脂を緩やかに攪拌しながら徐々に添加する工程、

10 (iv) さらに所定量の水を添加する工程からなり、

人又は動物を免疫しうる免疫原を、工程(i)の後であって、工程(ii)の前、工程(ii)~(iv)のいずれかの工程中、又は工程(iv)の後に添加することからなる経口投与用ワクチン含有エマルジョンの製法。

15 16. 工程(i)の親水性及び親油性非イオン界面活性剤の混合重量比が 9 : 1 ~ 1 : 1 である請求項 15 記載の経口投与用ワクチン含有エマルジョンの製法。

17. 工程(i)及び(ii)を同時に行い、その後、順次工程(iii)及び工程(iv)を行い、

20 免疫原を、工程(ii)の後であって、工程(iii)の前、工程(iii)又は(iv)のいずれかの工程中、又は工程(iv)の後に添加することからなる請求項 15 又は 16 のいずれかに記載の経口投与用ワクチン含有エマルジョンの製法。

18. (i) 親水性及び親油性非イオン界面活性剤（但し、混合

重量比が 20 : 1 ~ 1 : 1) を熔融混合して混合物を得る工程、  
(ii) 前記混合物に、少量の水を含有する多価アルコールを添加するか、又は少量の水及び多価アルコールを別々に添加する工程、

- 5 (iii) 得られた混合物に油脂を緩やかに攪拌しながら徐々に添加する工程、

(iv) さらに所定量の水を添加する工程からなり、

- 人又は動物を免疫しうる免疫原及び油滴界面吸着剤を、同時に又は別々に、工程(i)の後であって、工程(ii)の前、工程(i  
10 i) ~ (iv) のいずれかの工程中、又は工程(iv)の後に添加し、乾燥処理をすることからなる経口投与用ワクチン含有粉末の製法。

19. 工程(i)の親水性及び親油性非イオン界面活性剤の混合重量比が 9 : 1 ~ 1 : 1 である請求項 18 記載の経口投与用ワクチン含有エマルジョンの製法。

- 15 20. 工程(i)及び(ii)を同時に行い、その後、順次工程(ii)及び工程(iv)を行い、

- 免疫原及び油滴界面吸着剤を、同時に又は別々に、工程(ii)の後であって、工程(iii)の前、工程(iii)又は(iv)のいずれかの工程中、又は工程(iv)の後に添加することからなる請求項  
20 18 又は 19 のいずれかに記載の経口投与用ワクチン含有粉末の製法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00351

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int. Cl <sup>6</sup> A61K39/39, 39/00, 9/107, 9/14 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl <sup>6</sup> A61K39/39, 39/00, 9/107, 9/14 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS ONLINE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	JP, 6-507172, A (Affinity Biotech, Inc.), August 11, 1994 (11. 08. 94) & WO, 92/18147, A & EP, 580778, A	1 - 5 6 - 12 13 - 20
Y A	WO, 95/11700, A (Pharmos Corp.), May 4, 1995 (04. 05. 95)	1-12, 15-19 13, 14, 20
Y A	JP, 5-508385, A (Chiron Corp.), November 25, 1993 (25. 11. 93) & WO, 90/14837, A & EP, 399843, A	1-12, 15-19 13, 14, 20
Y A	JP, 5-294845, A (The Nisshin Oil Mills, Ltd.), November 9, 1993 (09. 11. 93) & EP, 544612, A	1-12, 15-19 13, 14, 20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search April 30, 1997 (30. 04. 97)		Date of mailing of the international search report May 13, 1997 (13. 05. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>4</sup> A61K39/39, 39/00, 9/107, 9/14

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>4</sup> A61K39/39, 39/00, 9/107, 9/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	JP, 6-507172, A (アフィニティー バイオテック, インコーポレイテッド) 11. 8月. 1994 (11. 08. 94) & WO, 92/18147, A & EP, 580778, A	1-5 6-12 13-20
Y A	WO, 95/11700, A (PHARMOS CORP.) 04. 05. 95	1-12, 15-19 13, 14, 20
Y A	JP, 5-508385, A (チロン コーポレイション) 25. 11月. 1993 (25. 11. 93) & WO, 90/14837, A & EP, 399843, A	1-12, 15-19 13, 14, 20

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 04. 97

国際調査報告の発送日

13.05.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

瀬下 浩一

4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3453



様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1992年7月)